

# 塩化ニッケルを用いた塩濃度勾配法による中性条件でのリゾチーム活性部位の X 線構造 X-ray structure of the active site of lysozyme under neutral conditions using nickel chloride gradient method

河部雄太<sup>1\*</sup>、石上千尋<sup>1</sup>、田中伊知朗<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>茨城大学, 〒316-8511 茨城県日立市中成沢町 4-12-1

Yuta KAWABE<sup>1\*</sup>, Chihiro ISHIGAMI<sup>1\*</sup> and Ichiro TANAKA<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Ibaraki University, 4-12-1, Nakanarusawa, Hitachi, Ibaraki 316-8511, Japan

## 1 はじめに

リゾチームのリガンドとなる N-acetylglucosamine の 4 量体 (NAG4) とリゾチームの複合体の中性子結晶構造解析を行い、反応機構を解明するための準備として、塩濃度勾配法という方法でリゾチーム単独での結晶作製を試みた。塩濃度勾配法の特徴は、リゾチームの大形結晶を短期間で得ることができることだ。しかし、タンパク質がリゾチーム、結晶化剤が塩化ニッケルの特異的な条件でしか用いることができない[1]。塩化ニッケルには約 8wt% の濃度でリゾチームの溶解度を極小にする。これによって底にたまっていた塩化ニッケルが次第に溶けて上方に拡散していく際にできる塩濃度勾配を利用する。

## 2 実験

### (1) 緩衝液の調整

今回、緩衝液として ① 0.05M CH<sub>3</sub>COOH / CH<sub>3</sub>COONa (pH4.5)、② 0.05M HEPES/NaOH (pD7.0) を用いた。pD は pH メーターを用いて計った。重水溶液の pH メーター読み取りは 0.4 低く調整すればよいので[2]、今回は pH6.6 で調整した。

① まず、0.2M CH<sub>3</sub>COOH と 0.2M CH<sub>3</sub>COONa をそれぞれ 50mL 調製し、酢酸溶液に酢酸ナトリウム溶液を pH メーターで確認しながら少しずつ加えていき、pH を 4.5 に調製した。この溶液と蒸留水が 1:3 となるように水を加えて 0.05M 酢酸 buffer とした。

② 将来の中性子構造解析実験に向けて、軽水の代わりに重水を用いて 50mM HEPES 緩衝液を作成した。まず、200mM HEPES 溶液を作成し、その溶液に 200mM 水酸化ナトリウム溶液を pD7.0 になるまで加え、200mM HEPES 緩衝液を調整した。この調整した溶液に 200mM HEPES 緩衝液：重水=1：3 になるように重水を加えて 50mM HEPES 緩衝液とした。

### (2) タンパク質溶液の調整

常温に戻した Merck 製のリゾチーム(L6876)を精製せずそのまま使用した。これを①、②で溶かした。

分光器で濃度測定を行い、これを原液として実験において使用する濃度に緩衝液を用いて調整した。最後にこれを薄めて 10~30mg/mL のタンパク質溶液を調整した。

### (3) 結晶化

まず結晶化剤として NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O を 1g はかり、10mL 試験管 5 本の底にそれぞれ入れた。次に 10,15,20,25,30mg/mL のリゾチーム溶液を静かにアプラインした。

## 3 結果および考察

### 結晶化結果

pH4.5 の結晶では一辺 1mm を超える結晶が多数確認できた。

pD7.0 の結晶ではリゾチーム濃度が 30mg/mL で一辺最大で 500μm 程度の結晶が得られた。



図 1 塩濃度勾配法によるリゾチーム結晶 (pH4.5)  
左 25mg/mL 右 30mg/mL



図2 塩濃度勾配法によるリゾチーム結晶 (pD7.0)  
左 25mg/mL 右 30mg/mL

X線回折実験を行い、データを解析した。緑マップは差フリーエマップで pH4.5 と pD7.0 の両方で水の酸素原子が完全に消える、10 シグマまで上げ、差フリーエマップが触媒基の近くに確認できた。溶液に Ni を使っていることから、そのマップは Ni だと考えた。

図3の右側の条件とほぼ同じ条件で結晶化したリゾチームの中性子データで、1IO5 という PDB がある[2]。そのモデルには、同じ触媒基の近くに Ni がいない少し不自然なモデルだったが、本実験では Ni を観測することができた。しかし pH4.5 pD7.0 のどちらも触媒基の近くに Ni があったことから、本来観察したい触媒基のまわりの様子を観察するのが困難であると予想されたので、複合体の結晶化条件には使用できないと判断した。

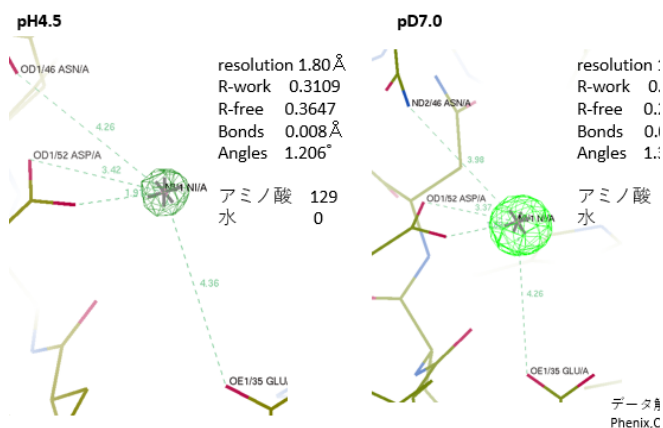


図3 X線回折結果

#### 4 まとめ

塩濃度勾配法によって短時間で大形リゾチーム結晶を得ることができた。

Niimura ら[2]とほぼ同じ条件で実験を行った結果、PDB : 1IO5 の触媒基付近では確認されていない Ni を確認し、最近の酸性条件の結果[3]と同様になった。

#### 参考文献

- [1] M. Ataka and T. Katsura, JAERI-M 92-213 p.61 (1993).
- [2] N. Niimura *et al.*, Nat Struct Biol 4 909-914 (1997).
- [3] T. Chatake *et al.*, Acta Cryst.D78, 770-778 (2022).

\*24nm926t@vc.ibaraki.ac.jp

\*ichiro.tanaka.h27@vc.ibaraki.ac.jp